

10. Zwei weitere Iridoid-glycoside und ein Monoterpen-glycosid aus *Sambucus ebulus* L. (Caprifoliaceae)

3. Mitteilung über die Inhaltsstoffe der Zwergholunderwurzel

von **Gian-Andrea Gross** und **Otto Sticher***

Pharmazeutisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, CH-8092 Zürich

und **Clemens Anklin**

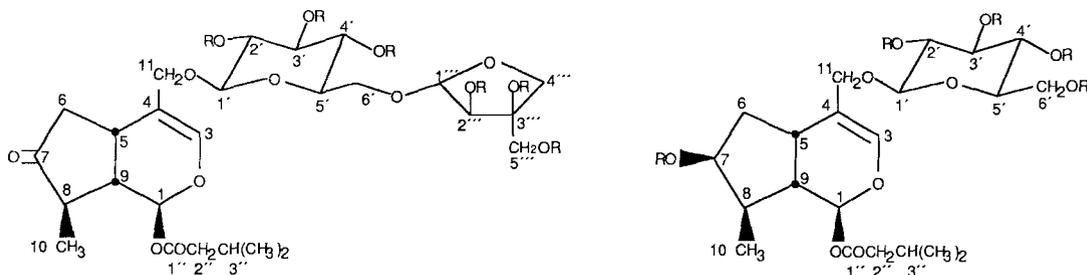
Spectrospin AG, CH-8117 Fällanden

(30. X. 86)

New Iridoid Glycosides and a Monoterpene Glycoside from *Sambucus ebulus* L. (Caprifoliaceae)

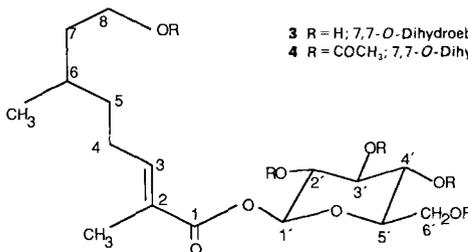
From the roots of *Sambucus ebulus* L., two novel valeriana-type ester iridoid glycosides, 6'-*O*-apiosylebuloside (**1**) and 7,7-*O*-dihydroebuloside (**3**), along with the open-chain monoterpene glycoside **5** were isolated. Their structure elucidation is based mainly on one- and two-dimensional NMR methods. ¹H, ¹H-COSY experiments permitted complete assignment of signals arising from the disaccharide unit in **1**. Biogenetically, **3** seems to represent the equivalent of loganin in the valeriana-type series of iridoid glycosides.

1. Einleitung. – Die Wurzeln des Zwergholunders (*Sambucus ebulus* L., Caprifoliaceae), die in der Volksmedizin als Diureticum Anwendung finden, enthalten ein Inhaltsstoffspektrum, welches sich als reich an Iridoid-glycosiden vom Valeriana-Typ erwies [1]:



1 R = H; 6'-*O*-Apiosylebulosid
2 R = COCH₃; 6'-*O*-Apiosylebulosid-hexaacetat

3 R = H; 7,7-*O*-Dihydroebulosid
4 R = COCH₃; 7,7-*O*-Dihydroebulosid-pentaacetat



5 R = H; (β-D-Glucopyranosyl)-8-hydroxy-2,6-dimethyloct-2-enoat
6 R = COCH₃; (2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-Glucopyranosyl)-8-acetoxy-2,6-dimethyloct-2-enoat

über die Hauptkomponente, Ebulosid, berichteten wir bereits [2] wie auch über Isoswerosid, ein neuartiges, zum Secoiridoid-glycosid Swerosid konstitutionsisomeres Glycosid [3]. Im gleichen Extrakt, aus dem Ebulosid isoliert worden war, konnten in geringeren Mengen zwei weitere bisher unbekannte, mit Ebulosid strukturell verwandte Iridoid-glycoside aufgefunden werden: das Diglycosid 6'-*O*-Apiosylebulosid (**1**), welches das erste Apiose enthaltende Iridoid-glycosid ist, und 7,7-*O*-Dihydroebulosid (**3**), das mögliche biogenetische Äquivalent von Loganin in der Reihe der Valerianaceen-Iridoide. Verbindung **5** ist ein ebenfalls bisher nicht beschriebenes offenkettiges Monoterpen-glycosid.

2. Ergebnisse und Diskussion. – 2.1. 6'-*O*-Apiosylebulosid (**1**). Das Diglycosid **1**, C₂₆H₄₀O₁₄, MG. 576 (abgeleitet aus FAB-MS, $[M + Na]^+ = 599$) ist ein amorphes, stark hygroskopisches Pulver ($[\alpha]_D^{20} = -215,5^\circ$). Die UV-Absorptionsmaxima bei 204 und 279 nm sowie das IR-Spektrum von **1** (Banden bei 3400 (br., OH), 1740 (C=O) sowie 1670 cm⁻¹ (C=C)) stimmten mit denjenigen von Ebulosid völlig überein. Lediglich im DC wurde eine gegenüber Ebulosid grössere Polarität festgestellt (gleiche braungelbe Farbreaktion bei der Detektion mit Vanillin/H₂SO₄/Erhitzen). Die Massendifferenz von 132 zu Ebulosid wies auf eine Pentose als zusätzlichen Substituenten hin.

Acetylierung von **1** mit Ac₂O/Pyridin bei Raumtemperatur ergab im DC unterschiedlich polare Produkte. Als Ursache wurde eine schwer acetylierbare, vermutlich tertiäre OH-Gruppe vermutet. Nachacetylierung nach [4] mit 4-(Dimethylamino)pyridin als Katalysator ergab das im DC einheitliche Hexaacetyl-Derivat **2**, C₃₈H₅₂O₂₀, M.G. 828 (abgeleitet aus FD-MS, $[M + Na]^+ = 851$), $[\alpha]_D^{20} = -115,1^\circ$.

¹H-NMR-Spektren von **1** und **2** (vgl. Tab. 1). Die eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren (300,13 MHz) von **1** und **2** stimmten im Bereich der Absorptionen der Aglycon-Protonen (1-3 ppm, > 6 ppm) völlig mit denjenigen von Ebulosid überein (für eine Diskussion der Signale des Aglycons siehe [2]), während der Zuckerbereich (3,8-6 ppm (**1**), 3,5-5,5 ppm (**2**)) Signale von 6 zusätzlichen H-Atomen enthielt (Fig. 1). Die Kopplungskonstante des anomeren Protons (5,8 ppm) der zweiten Zuckerkomponente von 2,5 Hz liess sich nicht mit einer der bekannten Pentopyranosen in Einklang bringen [6], hingegen erschien ein in Furanose-Form vorliegender Zucker möglich [5].

Das Kopplungsmuster der zur Disaccharid-Einheit gehörenden H-Atome konnte aus dem Vergleich der 2D-¹H, ¹H-NMR-COSY-Experimente an Ebulosid und **1** (Fig. 2) sowie aus denjenigen von **2** (Fig. 3) ermittelt werden. Danach enthielt die gesuchte Pentofuranose **3** getrennte Spinkopplungssysteme, ein AX- sowie zwei AB-Systeme, die untereinander weitreichende Kopplungen aufwiesen. Daraus wurde auf das Vorliegen eines verzweigt-kettigen Zuckers vom Typ der Apiose geschlossen; die vermutete, schwer acetylierbare OH-Gruppe war somit erklärt. Das bei tiefem Feld liegende AB-System in den Spektren von **1** und **2** wurde einer CH₂OH-Gruppe (Z5 = CH₂(5''))), das bei hohem Feld erscheinende der CH₂-Gruppe im Furanose-Ring (Z4 = CH₂(4'')) zugeordnet. Aus dem COSY-Experiment an **2** ging hervor, dass H-C(1'') (= Z1) und H-C(2'') (= Z2) weitreichende Kopplungen (⁴J, W-Stellung) mit je einem Proton der am Ring gegenüberliegenden CH₂-Gruppe (Z4 = CH₂(4'')) zeigten; dies war ein Hinweis auf die *trans*-Stellung von H-C(1'') und H-C(2''). Die Verknüpfung über CH₂(6') (= G6) der Glucose folgte aus der Lage bei höherem Feld (3,5 ppm) dieser Protonen beim Peracetat **2** verglichen mit Tetraacetylebuloosid.

¹³C-NMR-Spektrum von **1** (vgl. Tab. 2). Die ¹³C-NMR-Signale des Aglycons von **1** waren mit denjenigen von Ebulosid identisch. Die Signale des Zucker-Substituenten konnten unter Berücksichtigung einer lösungsmittel-abhängigen Signalverschiebung durch Vergleich mit denjenigen von Decurosid IV [7] eindeutig zugeordnet werden, was die Identität der gesuchten Zuckerkomponente mit Apiose bewies. Die Tieffeldverschiebung des Signals von CH₂(6') um etwa 6 ppm auf 70,51 ppm stand in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten von C(6)-substituierten Glucose-Derivaten [8].

Nach saurer Totalhydrolyse von **1** liessen sich im DC 2 Zuckerkomponenten, Glucose und Apiose, nachweisen, welche mit einem aus authentischem Apiin hergestellten Referenzmuster identisch waren. Die Konfiguration des Apiosyl-Restes von **1** konnte durch Vergleich der $[M]_D$ -Differenzen von **1** und Ebulosid mit derjenigen von Apiin [9] und

Tab. 1. ¹H-NMR-Daten der Iridoid-glycoside 1-4^a

Proton	1 ^b)	2 ^c)	3 ^d)	4 ^e)	5 ^f)
H-C(1)	6,54	(<i>d, J</i> = 2,5)	(<i>d, J</i> = 2,2)	(<i>d, J</i> = 4,5)	5,93 (<i>d, J</i> = 4)
H-C(3)	6,61	(<i>d, J</i> = 1,3)	(<i>br. s</i>)	(<i>s</i>)	7,25 (<i>s</i>)
H-C(5)	3,36	(<i>br. t, J</i> = 7,3)	(<i>br. t, J</i> = 7,3)	(<i>br. q, J</i> = 8)	2,85 (<i>br. q, J</i> = 7,7)
H _α -C(6)	3,08	(<i>br. t, J</i> = -19)	(<i>br. d, J</i> = -18,8)	(<i>m</i>)	1,8-2,2 (<i>m</i>)
H _β -C(6)	2,56	(<i>dd, J</i> = -19, 8,6)	(<i>dd, J</i> = -18,8, 8,6)	(<i>m</i>)	1,8-2,2 (<i>m</i>)
H-C(7)	-	-	4,07	(<i>m</i>)	5,15 (<i>m</i>)
H-C(8)	2,17	(<i>m</i>)	2,04-2,09 (<i>m</i>)	(<i>m</i>)	1,8-2,2 (<i>m</i>)
H-C(9)	2,54	(<i>ddd, J</i> = 11,2, 6,8, 2,5)	2,04-2,09 (<i>m</i>)	(<i>m</i>)	1,8-2,2 (<i>m</i>)
CH ₃ (10)	1,08	(<i>d, J</i> = 6,9)	1,11	(<i>d, J</i> = 6,6)	1,05 (<i>d, J</i> = 6,5)
CH ₂ (11)	4,27, 4,04	(<i>AB, J</i> = -12,8)	4,16, 3,92 (<i>AB, J</i> = -12)	4,26, 4,07 (<i>AB, J</i> = -12)	4,17, 4,03 (<i>AB, J</i> = -11,6)
H-C(1')	4,79	(<i>d, J</i> = 7,7)	4,43	(<i>d, J</i> = 8)	4,52 (<i>d, J</i> = 7,9)
H-C(2')	3,96	(<i>m</i>)	4,90	(<i>dd, J</i> = 8, 9,6)	5,0 (<i>dd, J</i> = 7,9, 9,6)
H-C(3')	4,14	(<i>m</i>)	5,11	(<i>t, J</i> = 9,6)	5,19 (<i>t, J</i> = 9,6)
H-C(4')	4,14	(<i>m</i>)	4,84	(<i>t, J</i> = 9,6)	5,07 (<i>t, J</i> = 9,6)
H-C(5')	4,06	(<i>m</i>)	3,60	(<i>m</i>)	3,67 (<i>ddd, J</i> = 9,6, 2,6, 4,8)
CH ₂ (6')	4,72	(<i>dd, A</i> von <i>ABX, J</i> = -11,2, 1,6)	3,64	(<i>dd, A</i> von <i>ABX, J</i> = -11,5, 1,8)	4,24 (<i>dd, A</i> von <i>ABX, J</i> = -11,6, 4,8)
	4,17	(<i>m</i>)	3,50	(<i>dd, B</i> von <i>ABX, J</i> = -11,5, 5,3)	4,07 (<i>dd, B</i> von <i>ABX, J</i> = -11,6, 2,6)
CH ₂ (2'')	2,21	(<i>d, J</i> = 8)	2,2	(<i>d, J</i> = 7,5)	2,34 (<i>m</i>)
H-C(3'')	2,08	(<i>m</i>)	2,04-2,09 (<i>m</i>)	(<i>m</i>)	2,0 (<i>m</i>)
2CH ₃ -C(3'')	0,88	(<i>d, J</i> = 6,6)	0,91	(<i>d, J</i> = 6,6)	0,98 (<i>d, J</i> = 6,5)
	0,87	(<i>d, J</i> = 6,6)	0,92	(<i>d, J</i> = 6,6)	
H-C(1''')	5,80	(<i>d, J</i> = 2,6)	5,23	(<i>br. s</i>)	-
H-C(2''')	4,75	(<i>d, J</i> = 2,6)	4,93	(<i>br. s</i>)	-
CH ₂ (4''')	4,06, 3,96	(<i>m</i>)	4,15, 4,06 (<i>AB, J</i> = -10,3)	-	-
CH ₂ (5''')	4,57, 4,34	(<i>AB, J</i> = -9,5)	4,51, 4,65 (<i>AB, J</i> = -12,3)	-	-
CH ₃ COO	-	1,92, 1,93, 1,96 (6 <i>s</i>)	1,97, 1,98, 2,01	-	1,99, 2,02, 2,03 (5 <i>s</i>) 2,04, 2,08

^a) Chemische Verschiebungen in ppm relativ zu internem TMS. In Klammern Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten in Hz.

^b) Aufgenommen in (D₃)Pyridin bei 400,13 MHz. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten wurden anhand eines auflösungsverbesserten Spektrums bestimmt.

^c) Aufgenommen in CDCl₃ bei 400,13 MHz.

^d) Aufgenommen in CD₃OD bei 300,13 MHz.

^e) Aufgenommen in CDCl₃ bei 300,13 MHz.

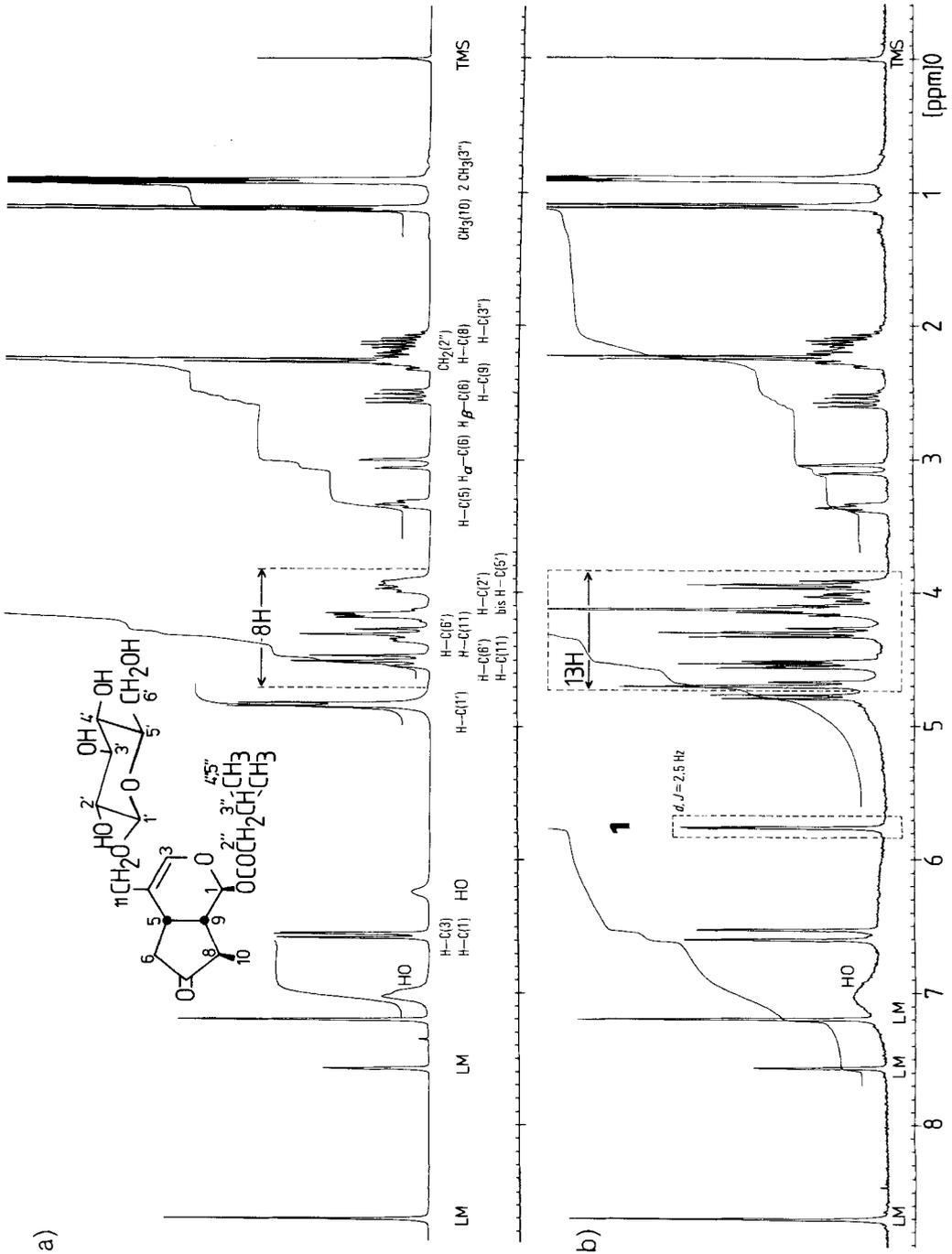


Fig. 1. Eindimensionale ¹H-NMR-Spektren (300,13 MHz, (D₃)Pyridin) von a) Ebutosid und b) 1. LM = Lösungsmittel.

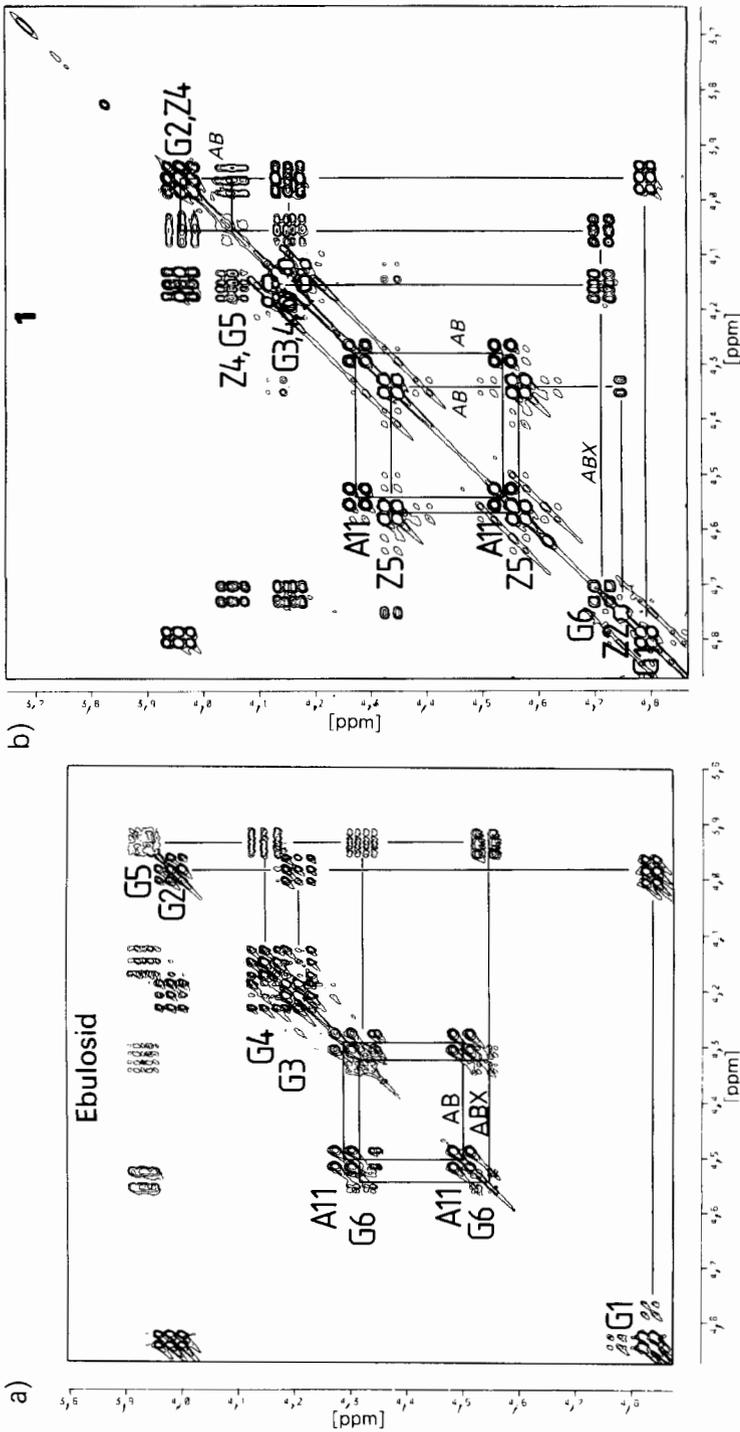


Fig. 2. $2D-^1H, ^1H-NMR-COSY$ -Experimente im Bereich der Zuckerprotonen von a) Ebuloosid (3,8–4,8 ppm) und b) 1 (3,7–4,8 ppm). A = zum Aglycon gehörige Signale, G = zum Glucose-Rest gehörige Signale, Z = zur 2. Zucker-Komponente gehörige Signale. Aufgenommen bei 400,13 MHz in $(D_3)Pyridin$.

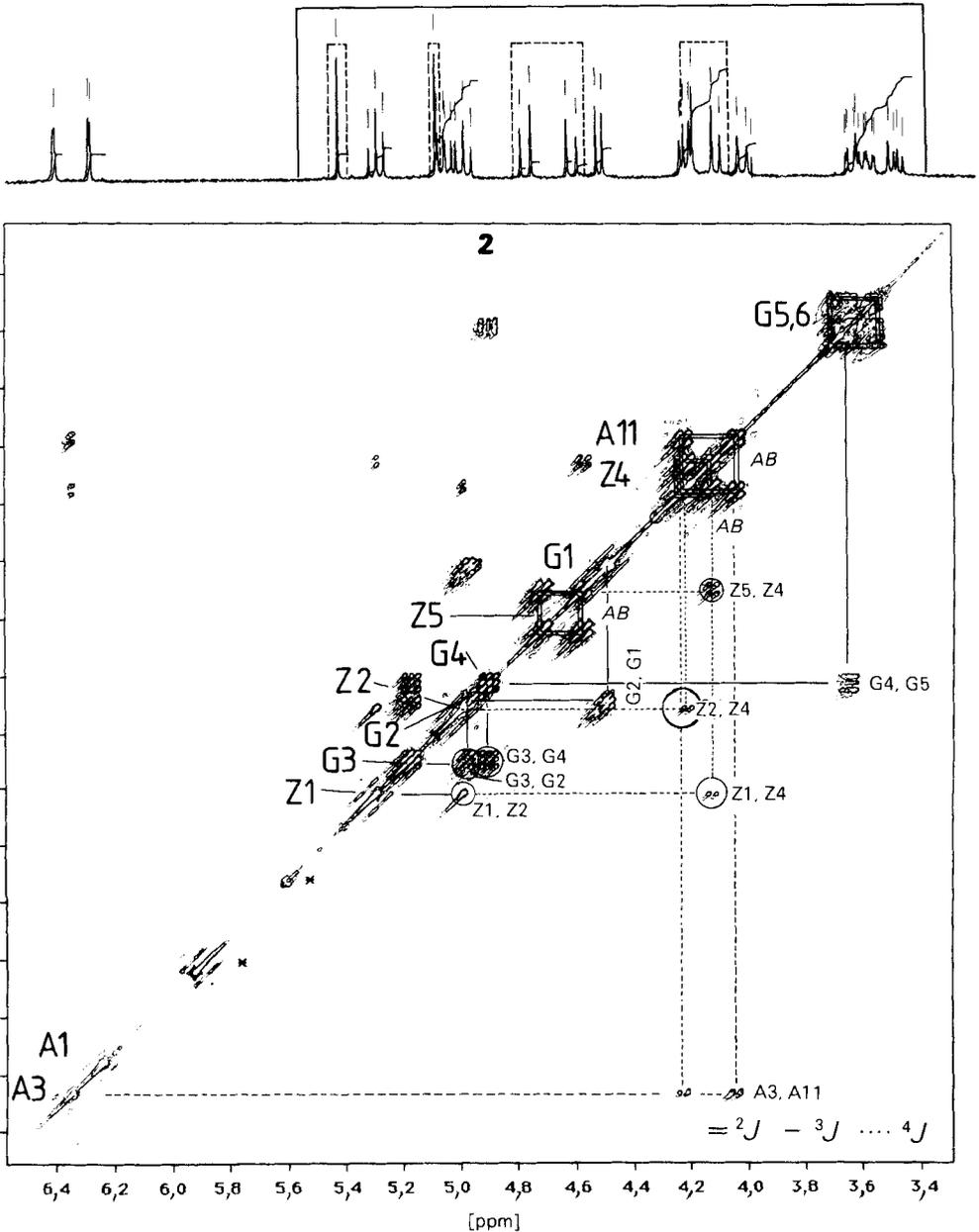


Fig. 3. 2D- ^1H , ^1H -NMR-COSY-Experiment an **2** (3,4-6,6 ppm).

Aufgenommen bei 400,13 MHz in CDCl_3 . Bedeutung der Abkürzungen wie in Fig. 2. Die deutlich sichtbaren weitreichenden Kopplungskonstanten $J(\text{Z}_1, \text{Z}_4)$ und $J(\text{Z}_2, \text{Z}_4)$ sind nur mit der *trans*-Stellung von $\text{H}-\text{C}(1'')$ und $\text{H}-\text{C}(2'')$ erklärbar. Sie dürften durch einen W-Kopplungsmechanismus zustandekommen. Mit * sind in den Messbereich hineingefaltete Signale bezeichnet.

Tab. 2. ^{13}C -NMR-Daten der Iridoid-glycoside **1**, Ebulosid und **3**^{a)}

C-Atom	1 ^{b)}	Ebulosid ^{b)}	3 ^{c)}
C(1)	92,65 (d)	92,32 (d)	93,57 (d)
C(3)	142,09 (d)	142,72 (d)	139,52 (d)
C(4)	114,57 (s)	114,42 (s)	117,03 (s)
C(5)	30,61 (d)	30,60 (d)	33,68 (d)
C(6)	42,84 (t)	42,72 (t)	40,65 (t)
C(7)	227,05 (s)	226,00 (s)	75,18 (d ^e)
C(8)	46,36 (d)	46,15 (d)	42,21 (d)
C(9)	46,70 (d)	46,72 (d)	46,62 (d)
C(10)	14,95 (q)	14,97 (q)	13,68 (q)
C(11)	71,49 (t)	71,21 (t)	69,90 (t)
C(1')	103,77 (d)	103,78 (d)	103,51 (d)
C(2')	75,95 (d)	75,81 (d)	75,18 (d ^e)
C(3')	78,63 (d)	78,59 (d ^e)	77,92 (d)
C(4')	72,51 (d)	72,32 (d)	71,71 (d)
C(5')	77,65 (d)	78,59 (d ^e)	78,15 (d)
C(6')	70,51 (t)	63,53 (t)	62,91 (t)
C(1'')	177,65 (s)	176,49 (s)	173,46 (s)
C(2'')	45,81 (t)	45,55 (t)	44,32 (t)
C(3'')	28,39 (d)	28,15 (d)	26,94 (d)
C(4'')/C(5'')	24,47 (q)	24,43 (q)	22,86 (q)
C(1''')	111,85 (d; 109,2 ^d)		
C(2''')	79,49 (d; 75,9 ^d)		
C(3''')	82,21 (s; 78,6 ^d)		
C(4''')	76,47 (t; 73,2 ^d)		
C(5''')	66,47 (t; 63,4 ^d)		

a) Chemische Verschiebungen in ppm relativ zu internem Natrium-[3-(trimethylsilyl)-1-propansulfonat] (**1** und Ebulosid) bzw. TMS (**3**).

b) Aufgenommen bei 75,47 MHz in D₂O.

c) Aufgenommen bei 75,47 MHz in CD₃OD.

d) Literaturwerte von Decurosid IV, aufgenommen in (D₆)DMSO; es werden nur die δ_c des Zucker-Restes aufgeführt [7]: die Lösungsmittel-Verschiebung beträgt bei Vergleich der Apiose-Reste –3 ppm ($\pm 0,5$ ppm) beim Wechsel von D₂O zu (D₆)DMSO.

e) Signal doppelter Intensität.

7-O-(β -D-Glucopyranosyl)apigenin [9] hergeleitet werden¹⁾. Aus der in der Grössenordnung dem $[M]_D$ des Methyl-glycosids von β -D-Apiose ($[M]_D = -405^\circ$ [9]) ähnlichen Differenz zwischen Di- und Monoglycosid der beiden Substanzpaare wurde für den Apiosyl-Rest in **1** β -D-Konfiguration abgeleitet.

2.2. 7,7-O-Dihydroebulosid (**3**). Das Glycosid **3** C₂₁H₃₄O₁₀, MG. 446 (abgeleitet aus FAB-MS, $[M + H]^+ = 447$) wurde als amorphes, hygroskopisches Lyophilisat erhalten ($[\alpha]_D^{20} = -73,8^\circ$; im DC mit Vanillin/H₂SO₄/Erhitzen hellviolett und mit baldrian-artigem Geruch). Die IR-Banden lagen gleich wie bei **1**, im UV-Spektrum wurde ein Maximum bei 204 nm festgestellt. Aus dem gegenüber Ebulosid um 2 Masseneinheiten grösseren MG. wurde auf das Vorliegen der an C(7) reduzierten Verbindung geschlossen. Die

¹⁾ $[M]_D^{20}$ (**1**, H₂O) = -1241° , $[M]_D^{20}$ (Ebulosid, H₂O) = -877° , $\Delta[M]_D = -364^\circ$; $[M]_D^{22}$ (Apiin, MeOH) = -754° , $[M]_D^{22}$ ((7-O- β -D-Glucosyl)apigenin, MeOH) = -349° , $\Delta[M]_D = -405^\circ$.

Abwesenheit einer Keton-CO-Gruppe ging auch daraus hervor, dass um 280 nm im UV-Spektrum keine Absorption festgestellt wurde [10]. Nach enzymatischer Hydrolyse von **3** wurde ein stabiles öliges Aglycon erhalten. Die Differenz der $[M]_D$ von Glycosid und Aglycon (-61°) stand in vernünftiger Übereinstimmung mit dem $[M]_D$ von Methyl- β -D-glucosid ($-57,5^\circ$ [11]), woraus auf die D-Konfiguration der Glucose geschlossen wurde. Acetylierung mit Ac_2O /Pyridin bei Raumtemperatur ergab das Pentaacetyl-Derivat **4**, $C_{31}H_{44}O_{15}$, MG. = 656, $[\alpha]_D^{20} = -65,2^\circ$.

¹H-NMR-Spektrum von **3** und **4** (vgl. Tab. 1). Sämtliche Protonen des Cyclopenta[c]pyran-Gerüsts liessen sich durch Doppelresonanz-Experimente identifizieren (vgl. [1]). Das Signal bei 4,07 ppm (*m*, 1 H) bewies die vermutete OH-Gruppe an C(7) (bei **4** auf 5,15 ppm entschirmt (Acylierungstieffeldverschiebung); vgl. Loganin (H-C(7) bei 4,04 ppm) und Periclymenosid (H-C(7) bei 5,3 ppm) [12]). Die Konfiguration an C(8) liess sich ebenfalls aus den ¹H-NMR-Daten von H-C(7) und H-C(9) ableiten: **3** zeigt für H-C(9) und H-C(7) fast identische δ -Werte wie Loganin [12] (**3**: 2,02 bzw. 4,07 ppm; Loganin: 2,03 bzw. 4,04 ppm), wohingegen 8-Epiloganin [1], bei welchem CH_3 -C(8) nicht synperiplanar zu H-C(9) steht, abweichende Werte zeigt (H-C(9) bei 2,59 bzw. H-C(7) bei 3,80 ppm). Aus diesem Befund kann für **3** dieselbe relative Konfiguration an C(7) wie für Loganin abgeleitet werden.

¹³C-NMR-Spektrum von **3**. Wie erwartet fehlte im Spektrum von **3** bei Vergleich mit demjenigen von Ebulosid das um 220 ppm liegende Signal von C(7) zugunsten eines zusätzlichen *d* um 75 ppm. Die übrigen Signal-Lagen des Iridoid-Gerüsts, der Isovaleryl-Gruppe sowie des Glucose-Substituenten stimmten mit den Messwerten von Ebulosid [2] überein. Der Vergleich der chemischen Verschiebung von C(7) bei **3** und dem Paar Loganin/8-Epiloganin [1] [12] [13] zeigte ebenso die Übereinstimmung der relativen Konfiguration an C(7) mit Loganin.

2.3. (β -D-Glucopyranosyl)-8-hydroxy-2,6-dimethyloct-2-enoat (**5**). Das Glycosid **5**, $C_{16}H_{28}O_8$, MG. 348 (abgeleitet aus FAB-MS, $[M + H]^+ = 349$) wurde als amorphes, hygroskopisches Lyophilisat erhalten ($[\alpha]_D^{20} = -9,31^\circ$; im DC mit Vanillin/ H_2SO_4 /Erhit-

Tab. 3. ¹H-NMR-Daten von **5**^{a)}

Proton	5 ^{b)}	6 ^{c)}
H-C(3)	6,91 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,5, 1,4)	6,83 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,5, 1,4)
CH ₂ (4)	2,25 (<i>m</i>)	2,15 (<i>m</i>)
CH ₂ (5)	1,5, 1,35 (<i>m</i>)	1,27-1,69 (<i>m</i>)
H-C(6)	1,6 (<i>m</i>)	1,27-1,69 (<i>m</i>)
CH ₂ (7)	1,6, 1,35 (<i>m</i>)	1,27-1,69 (<i>m</i>)
CH ₂ (8)	3,6 (<i>m</i>)	4,05-4,13 (<i>m</i>) ^{d)}
CH ₃ -C(2)	1,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 0,8)	1,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,2)
CH ₃ -C(6)	0,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5)	0,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4)
H-C(1')	5,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)	5,74 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)
H-C(2')	3,3-3,5 (<i>m</i>)	5,21 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,9, 9,5)
H-C(3')	3,3-3,5 (<i>m</i>)	5,28 (<i>t</i> , <i>J</i> = 9,5)
H-C(4')	3,3-3,5 (<i>m</i>)	5,14 (<i>t</i> , <i>J</i> = 9,5)
H-C(5')	3,3-3,5 (<i>m</i>)	3,87 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 9,5, 4,5, 2,3)
CH ₂ (6')	3,83 (<i>dd</i> , <i>A</i> von <i>ABX</i> , <i>J</i> = -11,8, 1,1)	4,3 (<i>dd</i> , <i>A</i> von <i>ABX</i> , <i>J</i> = -12,5, 4,5)
	3,67 (<i>dd</i> , <i>B</i> von <i>ABX</i> , <i>J</i> = -11,8, 4,4)	4,05-4,13 (<i>m</i>) ^{d)}
CH ₃ COO	-	2,07, 2,04, (5 <i>s</i>) 2,03, 2,02, 2,0

^{a)} Chemische Verschiebungen in ppm relativ zu internem TMS. In Klammern Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten in Hz.

^{b)} Aufgenommen in CD_3OD bei 300,13 MHz.

^{c)} Aufgenommen in $CDCl_3$ bei 300,13 MHz.

^{d)} Signale überlagert.

zen grau). Aus den IR- und UV-Spektren von **5** (Banden bei 3400, 2900, 1700 und 1640 cm^{-1} ; λ_{max} 220 nm) wurde auf das Vorliegen eines α,β -ungesättigten Carbonsäureesters geschlossen [10]. Saure Hydrolyse lieferte mittels DC nachweisbare Glucose. Daraus ergab sich für das Aglycon von **5** die Summenformel eines Monoterpens ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$). Acetylierung mit Ac_2O /Pyridin bei Raumtemperatur ergab das Pentaacetyl-Derivat **6**, $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$, MG. 558, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10,5^\circ$.

NMR-Spektren von 5 und 6 (vgl. Tab. 3 und 4). Das H-breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum von **5** wies 16 C-Signale auf, was mit einem glycosylierten Monoterpen vereinbar war. Zwei Vergleichsverbindungen, Phlebotricosid [14] und 2,3-Dihydrogeraniol [15] ermöglichten die eindeutige Zuordnung der Signale. Die (*E*)-Konfiguration an der Doppelbindung folgte aus der chemischen Verschiebung von $\text{CH}_3\text{-C}(2)$ (12,55 ppm)²⁾. Die Signale der Glucose-Einheit wurden gemäss Bock und Pedersen [18] zugeordnet.

Die ^1H -NMR-Spektren von **5** und **6** standen in Einklang mit dem obengenannten Strukturvorschlag: Zur Zuordnung der in einem komplexen *m* zwischen 1,2 und 1,7 ppm absorbierenden Signale von $\text{CH}_2(5)$, $\text{CH}(6)$ und $\text{CH}_2(7)$ von **5** genügte die Entkopplung von $\text{CH}_2(4)$; eines der Protonen der zum *ABX*-Spinsystems vereinfachten $\text{CH}_2(5)$ -Gruppe zeigte durch den 'Dacheffekt' [19] eindeutig die Lage der Protonen an C(7) und C(6)³⁾. Die starke Entschirmung des anomeren Protons der Glucose-Einheit (5,28 ppm) bewies ihre Substitution an C(1). Das Pentaacetyl-Derivat **6** zeigte wie erwartet Absorptionen von 5 Ac-Gruppen.

Tab. 4. ^{13}C -NMR-Daten von **5**^{a)} und Vergleichsverbindungen

C-Atom	5 ^{b)}	2,3-Dihydrogeraniol [15] ^{c)}	Phlebotricosid [14] ^{d)}
C(1)	168,20 (<i>s</i>)	25,7 (<i>q</i>)	170,2 (<i>s</i>)
C(2)	128,16 (<i>s</i>)	130,7 (<i>s</i>)	127,1 (<i>s</i>)
C(3)	145,85 (<i>d</i>)	125,0 (<i>d</i>)	144,5 (<i>d</i>)
C(4)	27,40 (<i>t</i>)	25,6 (<i>t</i>)	23,6 (<i>t</i>)
C(5)	36,93 (<i>t</i>)	37,4 (<i>t</i>)	40,7 (<i>t</i>)
C(6)	30,57 (<i>d</i>)	29,4 (<i>d</i>)	72,9 (<i>s</i>)
C(7)	40,66 (<i>t</i>)	39,8 (<i>t</i>)	143,5 (<i>d</i>)
C(8)	61,03 (<i>t</i>)	60,2 (<i>t</i>)	112,2 (<i>d</i>)
$\text{CH}_3\text{-C}(2)$	12,55 (<i>q</i>)	17,6 (<i>q</i>)	12,3 (<i>q</i>)
$\text{CH}_3\text{-C}(6)$	19,91 (<i>q</i>)	19,6 (<i>q</i>)	27,3 (<i>q</i>)
C(1')	95,94 (<i>d</i>)		102,2 (<i>d</i>)
C(2')	74,05 (<i>d</i>)		74,1 (<i>d</i>)
C(3')	78,12 (<i>d</i>)		76,9 (<i>d</i>)
C(4')	71,10 (<i>d</i>)		71,5 (<i>d</i>)
C(5')	78,77 (<i>d</i>)		74,8 (<i>d</i>)
C(6')	62,40 (<i>t</i>)		65,0 (<i>t</i>)

^{a)} Chemische Verschiebungen in ppm relativ zu internem TMS.

^{b)} Aufgenommen bei 75,47 MHz in CD_3OD .

^{c)} Aufgenommen bei 20 MHz in CDCl_3 .

^{d)} Aufgenommen bei 25 MHz in D_2O (δ in ppm rel. zu int. Dioxan).

Herrn Dr. P. Bollinger von der Firma Sandoz AG, Basel, sind wir für die Messung des FD-MS von **2** zu Dank verpflichtet.

²⁾ Ähnliche Verhältnisse liegen bei Nemorosid vor: von Junior [16] wurde gezeigt, dass die entsprechende Verbindung mit (*Z*)-Konfiguration (Dimeroperaticsäure-methylester) das *q* bei 20,5 ppm [17] aufweist.

³⁾ Das ^1H -NMR-Spektrum ist in [1] abgebildet.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Vgl. [2]. Pyridin (*p. a.*, Merck) und Ac_2O (*p. a.*, Merck) wurden frisch destilliert; 4-(Dimethylamino)pyridin (*purum*, Fluka). Reinigung der wässrigen Hydrolysate: Dowex 2X4 (OH-Form), BondelutTM-C18 und -Aluminiumoxid-Kartuschen. Säulenchromatographie: Kieselgel HF 254 (Merck). ¹H-NMR-Spektren: δ -Werte in ppm, *J* in Hz; Bruker-WM-300 und AM-400-Spektrometer. 2D-NMR-Spektren (COSY): Bedingungen wie für Ebulosid [2] mit Ausnahme der Transformationsgrösse, 1K \times 2K für 1 und 2, sowie der spektralen Breite, 976 Hz für 1 und 1319 Hz für 2. FD-MS: *m/z*; CEC-21-110B-Spektrometer.

Isolierung von 6'-O-Apiosylebulosid (1). Details zur Aufarbeitung des Rohextraktes siehe [3]. In einer komplexen Mischung mit anderen Inhaltsstoffen wurde 1 nach Passage der Sammelfraktion 2 des durch Craig-Verteilung vorgereinigten Rohextraktes über Sephadex-LH 20 in den Fraktionen 128–145 (1,84 g) an seiner mit Ebulosid identischen Farbreaktion im DC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 100:30:3) erkannt: R_f 0,36 (Ebulosid, R_f 0,52). Mittels RP-Niederdruckchromatographie [1] (Säule 1,8 \times 90 cm, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ i-PrOH/ H_2O 20:80, Injektionsmengen ca. 380 mg, 1,5 ml/min, Fraktionsvolumen 12 ml, UV-Detektion (206 nm)) wurde 1 vom grössten Teil der Begleitstoffe befreit. Säulenchromatographie (1,5 \times 40 cm, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 75:25, 0,6 ml/min) ergab schliesslich 25 mg 1.

Isolierung von 7,7-O-Dihydroebulosid (3) und (β -D-Glucopyranosyl)-8-hydroxy-2,6-dimethyloct-2-enoat (5). Nach Passage der Craig-Sammelfraktion über Sephadex-LH 20 wurden 3 und 5 in den Fraktionen 164–175 (0,96 g) gefunden. Die Feintrennung des Gemisches erfolgte ebenfalls mittels RP-Niederdruckchromatographie [1] (Säule 1,8 \times 90 cm, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ MeOH/ H_2O 50:50, 1,7 ml/min, Injektionsmenge 211 mg, Fraktionsvolumen 12 ml, UV-Detektion (206 nm)): 59 mg reines 3 (Fraktionen 195–210) und 70 mg leicht verunreinigtes 5 (Fraktionen 140–147). Die Nachreinigung von 5 mittels RP-Niederdruckchromatographie (Säule 1,1 \times 90 cm, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ MeOH/ H_2O 35:65, 2 ml/min, Injektionsmenge 70 mg) ergab 40 mg reines 5.

6'-O-Apiosylebulosid (= Isovaleriansäure-{4-[(O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyloxy)methyl]-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-7 β -methyl-6-oxocyclopentaf c]pyran-1 β -yl}ester; 1). $[\alpha]_D^{20} = -215,5^\circ$ ($c = 0,51$, H_2O). UV (MeOH): 204 (3,79), 279 (1,39). IR (KBr): 3400 (br., OH), 1740 (C=O), 1670 (C=C). FAB-MS (Glycerin): 691 ($[M + \text{Glyc} + \text{Na}]^+$, 0,4), 615 ($[M + \text{K}]^+$, 0,65), 599 ($[M + \text{Na}]^+$, 70), 577 ($[M + \text{H}]^+$, 0,45), 427 ($[M - \text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5]^+$, 0,6), 325 ($[M - \text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5 - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 17), 265 ($[\text{Aglycon}]^+$, 100), 85 (100), 57 (100). ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 1 und 2.

6'-O-Apiosylebulosid-pentaacetat bzw. -hexaacetat (= Isovaleriansäure-{4-[(O-(2,5-di-O-acetyl- β -D-apiofuranosyl)-(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)methyl]-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-7 β -methyl-6-oxocyclopentaf c]pyran-1 β -yl}ester bzw. Isovaleriansäure-{1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-7 β -methyl-6-oxo-4-[(O-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-apiofuranosyl)-(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)methyl]cyclopentaf c]pyran-1 β -yl}ester, 2). Bei 40° wurden 15 mg 1 mit 2 ml Ac_2O /Pyridin 4 h gerührt. DC-Kontrolle (Silicagel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2) des Eindampfrückstandes zeigte 2 Flecken, R_f 0,47 (Hauptkomponente), R_f 0,85. Ohne Reinigung wurde das Gemisch (16,1 mg) mit 6 mg ($4,91 \cdot 10^{-5}$ mol) 4-(Dimethylamino)pyridin und 6 mg ($5,9 \cdot 10^{-5}$ mol) Ac_2O in 1 ml CHCl_3 versetzt und 12 h bei RT. stehengelassen. DC-Kontrolle: 1 Fleck, R_f 0,85. Der Katalysator wurde durch Filtration des in 0,5 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 gelösten Gemisches über BondelutTM-Si-HPLC-Probenreinigungskartuschen (Analytichem) mit 5 ml desselben Lsgm. abgetrennt: 12 mg 2. Schmp. 125°. $[\alpha]_D^{20} = -115,1^\circ$ ($c = 0,18$, CHCl_3). UV (MeOH): 205 (3,33), 279 (1,39). IR (KBr): 1750, 1665. FD-MS: 867 ($[M + \text{K}]^+$, 21), 851 ($[M + \text{Na}]^+$, 100), 828 ($[M]^+$, 17), 547 ($[\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{15}]^+$, 5), 265 ($[\text{Aglycon}]^+$, 2), ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 1 und 2.

Saure Totalhydrolyse von 1. Ein Gemisch von 5 mg 1 und 10 ml 0,1N HCl wurde 45 min unter Rückfluss und unter N_2 erhitzt. Im Et_2O -Extrakt des Hydrolysates waren lediglich Zersetzungsprodukte des Aglycons nachweisbar (DC). Die wässrige Phase wurde über 5 g Dowex 2X4 neutralisiert, durch RP18- und Alox-Probenaufbereitungskartuschen filtriert (H_2O), eingedampft und in 250 μ l trockenem Pyridin aufgenommen. Mit einem Referenzmuster aus Apiin (Roth) wurde gleich verfahren (1N HCl, 120 min Rückfluss, 10 g Dowex). Es wurden folgende DC-Systeme verwendet (Auftragungsmenge 35 μ l): Cellulose und Pyridin/EtOAc/AcOH/ H_2O 36:36:7:21, Glucose R_f 0,34, Apiose R_f 0,64, Silicagel und i-PrOH/EtOAc/ H_2O 7:2:1, Glucose R_f 0,55, Apiose $R_f = 0,72$; Silicagel und Pyridin/BuOH/ H_2O 6:4:3, Glucose R_f 0,76, Apiose R_f 0,82. Detektion mit Anisidin-phthalat: Glucose grüngelb, Apiose ockergelb; mit Naphthoresorcin/ H_2SO_4 : Glucose rotviolett, Apiose grünblau.

7,7-O-Dihydroebulosid (= Isovaleriansäure-{4-[(β -D-glucopyranosyloxy)methyl]-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-6 β -hydroxy-7 β -methylcyclopentaf c]pyran-1 β -yl}ester; 3). $[\alpha]_D^{20} = -73,8^\circ$ ($c = 0,6$, MeOH). UV (MeOH): 204 (3,8). IR (KBr): 3400 (br., OH), 1750 (C=O), 1665 (C=C). FAB-MS (Glycerin): 893 ($[2M + \text{H}]^+$, 6,5), 723 ($[M + 3 \text{ Glyc} + \text{H}]^+$, 4,2), 631 ($[M + 2 \text{ Glyz}]^+$, 10), 539 ($[M + \text{Glyc} + \text{H}]^+$, 32), 469 ($[M + \text{Na}]^+$, 16), 447 ($[M + \text{H}]^+$, 60), 85 (100), 57 (90). ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 1 und 2.

Enzymatische Hydrolyse von 3. Durchführung wie in [2] für Ebulosid beschrieben. Aglycon von 3: DC (Silicagel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2): R_f 0,2. $[\alpha]_D^{20} = -94,5^\circ$ ($c = 0,47$, MeOH).

7,7-O-Dihydroebulosid-pentaacetat (= Isovaleriansäure-{6 β -O-acetyl-1,4 $\alpha\alpha$,5,6,7,7 $\alpha\alpha$ -hexahydro-7 β -methyl-4-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)methyl]cyclopent[*c*]pyran-1 β -yl}ester; **4**). Schmp. 112°. [α]_D²⁰ = -65,2° (*c* = 0,45, CHCl₃). UV (MeOH): 205 (3,9). IR (KBr): 1760 (C=O), 1660 (C=C). EI-MS: kein *M*⁺, 331 (15), 208 (18), 169 (74), 147 (17), 109 (33), 85 (100), 57 (67), 43 (78). ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 1 und 2.

(β -D-Glucopyranosyl)-8-hydroxy-2,6-dimethyloct-2-enoat (**5**). [α]_D²⁰ = -9,31° (*c* = 0,72, MeOH). UV (MeOH): 220 (4,15). IR (KBr): 3400 (br., OH), 2900 (C-H), 1700 (C=O), 1640 (C=C). FAB-MS (NOBA [20]): 719 ([2*M* + Na]⁺, 1), 697 ([2*M* + H]⁺, 0,9), 371 ([*M* + Na]⁺, 46,5), 349 ([*M* + H]⁺, 14), 187 ([C₁₀H₁₈O₃ + H]⁺, 100). ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 4 und 5.

Saure Hydrolyse von **5**. Unter Rückfluss wurden 5 mg **5** in 10 ml 2*N* HCl 2 h gekocht. Im Pyridin-Extrakt der nach Neutralisation (NaHCO₃) lyophilisierten wässr. Phase wurde mittels DC Glucose nachgewiesen (i-PrOH/EtOAc/H₂O 7:2:1 und Pyridin/BuOH/H₂O 6:4:3).

(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-8-acetoxy-2,6-dimethyloct-2-enoat (**6**). Herstellung nach Standardmethode (Ac₂O/Pyridin, vgl. [2]). Klares Öl. [α]_D²⁰ = -10,5° (*c* = 0,36, CHCl₃). UV (MeOH): 220 (4,19). IR (KBr): 1750 (C=O), 1645 (C=C). EI-MS: kein *M*⁺, 331 (5,7), 211 (15,6), 169 (34,4), 149 (12), 135 (10,1), 123 (25,4), 115 (14,8), 109 (19,1), 95 (28,6), 83 (11), 82 (10,7), 81 (18,6), 71 (14,3), 69 (21,5), 67 (17,2), 57 (24,8), 55 (23,1), 43 (100), 41 (19,9), 29 (9,2). ¹H- und ¹³C-NMR: Tab. 3 und 4.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G.-A. Gross, Diss. ETH Zürich Nr. 7800, 1985.
- [2] G.-A. Gross, O. Sticher, C. Anklin, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 156.
- [3] G.-A. Gross, O. Sticher, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1113.
- [4] G. Höfle, W. Steglich, *Synthesis* **1972**, 619.
- [5] C. Altona, C.A.G. Haasnoot, *Org. Magn. Reson.* **1980**, *13*, 417.
- [6] N. Cyr, A. S. Perlin, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2504.
- [7] T. Asahara, I. Sakakibara, T. Okuyama, S. Shibata, *Planta Med.* **1984**, *50*, 488.
- [8] C. Laffitte, A.-M. Nguyen Phuoc Du, F. Winternitz, R. Wylde, *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 105.
- [9] R. K. Hulyalkar, J. K. N. Jones, M. B. Perry, *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2085.
- [10] E. Pretsch, Th. Clerc, J. Seibl, W. Simon, 'Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden', Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 2. Auflage, S.U10.
- [11] A. Bose, B. G. Chatterjee, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1425.
- [12] A. J. Chulia, Thèse, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1984.
- [13] S. Damtoft, S. R. Jensen, B. J. Nielsen, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2717.
- [14] T. Hase, T. Iwagawa, K. Munesada, *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1435.
- [15] F. Bohlmann, R. Zeisberg, *Org. Magn. Reson.* **1975**, *7*, 426.
- [16] P. Junior, 'Phytochemische Untersuchungen innerhalb der Gattung Penstemon', Habilitationsschrift, Philipps-Universität Marburg, 1983.
- [17] F. Bohlmann, J. Ziesche, R. H. King, H. Robinson, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1335.
- [18] K. Bock, Ch. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27.
- [19] H. Günther, NMR-Spektroskopie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1983, 2. Auflage, S.43.
- [20] J. Meili, J. Seibl, *Org. Mass Spectrom.* **1984**, *19*, 581.